

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Applicant: Thomas Koehler  
Serial No: Art Unit:  
Filing Date:  
Title: REACTION CHAMBERS COATED WITH DEFINED  
CONCENTRATIONS OF NUCLEIC ACIDS, METHOD FOR THE  
PRODUCTION AND USE THEREOF

Examiner:

Priority application: Country: Germany  
Priority application number: 19840531.6  
Priority date: 28 August 1998

PCT Application no: PCT/DE99/02715  
PCT Application filing date: 27 August 1999

-----  
February 27, 2001

Attorney's Docket No.: WEH204

CLAIM OF PRIORITY

Hon. Commissioner of Patents and Trademarks  
Box PCT  
Washington, D.C. 20231

Sir:

Pursuant to Title 35, United States Code, Section  
119 (1952), the undersigned hereby claims the benefit of the  
filing date of a prior foreign patent application forming a  
basis of the PCT application viz.:

Country: Germany

Application No.: 198 40 531.6

Date of Filing: 28 August 1998

In support of this claim, a certified copy of the

**This Page Blank (uspto)**

aforementioned foreign patent application is believed to have been submitted by the World Intellectual Property Organization and should have been received by the United States Patent and Trademark Office prior to the expiration of 20 months from the first priority date of the application.

Respectfully submitted,

Thomas Koehler

By: 

Robert J. Ferb, his attorney,  
13 Forest Drive, Warren, N.J. 07059  
Tel.: (908) 757-2839 Fax: (908) 668-5262  
Reg.No. 29536; Docket No.: WEH204

\*%ptn:pctnat:2(WEH204PC(Feb. 27, 2001(tm

**This Page Blank (uspto)**

REC'D 26 NOV 1999

WIPO

PCT



DE 99/2715

**PRIORITY  
DOCUMENT**SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)**Bescheinigung**

Herr Dr. Thomas K ö h l e r in Borsdorf/Deutschland hat eine Patentanmeldung  
unter der Bezeichnung

"Mit Nukleinsäuren beschichtete Reaktionsräume, Verfahren zu  
ihrer Herstellung und ihre Verwendung"

am 28. August 1998 beim Deutschen Patent- und Markenamt eingereicht.

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprüng-  
lichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patent- und Markenamt vorläufig die Symbole  
C 12 Q, C 07 H und C 12 M der Internationalen Patentklassifikation erhalten.

München, den 28. Oktober 1999

Deutsches Patent- und Markenamt

Der Präsident

Im Auftrag

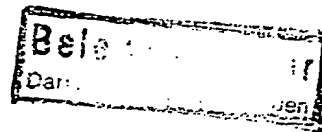
Nietiedt

Aktenzeichen: 198 40 531.6

## Zusammenfassung

Reaktionsräume mit definierten Konzentrationen von Nukleinsäuren, Verfahren zur Beschichtung der Reaktionsräume, die zur Standardisierung quantitativer enzymatischer Nachweisverfahren dienen, dadurch gekennzeichnet daß die Konzentration der verwendeten Nukleinsäuren exakt ermittelt wird, hiervon eine den erwarteten Meßbereich erfassende Verdünnungsreihe unter Verwendung einer physikalisch in kleinere Fragmente überführten Träger-Nukleinsäure hergestellt wird, wobei Aliquote dieser Nukleinsäure-Verdünnungen in für enzymatische Amplifizierungen geeigneten Reaktionsräumen einer schonenden Trocknung unterworfen werden, wobei 8 verschiedene Konzentrationen der jeweils lyophilisierten Standard-Nukleinsäure als "ZeptoStrip" bezeichnet werden und Testkit, in dem das erfindungsgemäße Verfahren Anwendung findet.

## Mit Nukleinsäuren beschichtete Reaktionsräume, Verfahren zu ihrer Herstellung und ihre Verwendung



### Beschreibung

Die Erfindung betrifft mit Nukleinsäuren beschichtete Reaktionsgefäße, Verfahren zu ihrer Herstellung durch die Beschichtung der Gefäße mit Standard-Nukleinsäuren, einen Testkit, enthaltend einen Standard-Strip, hergestellt unter Verwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens, einen Satz von mindestens zwei Oligonukleotiden, die hierfür geeignet sind, einer Träger-Nukleinsäure sowie eine Vielzahl von Verwendungsmöglichkeiten des Verfahrens für den quantitativen Nachweis ausgewählter Nukleinsäuren in biologischen Substanzen.

Viele Bereiche in der klinischen Forschung und Diagnostik, der pharmakologischen Wirkstoffprüfung sowie der Lebensmittelanalytik machen es erforderlich, Konzentrationen bestimmter Nukleinsäuren (Desoxyribonukleinsäure [DNA]- oder Ribonukleinsäure [RNA]) in einer zu analysierenden Probe genau zu kennen. Zur Messung insbesondere extrem geringer Analytkonzentrationen kommen häufig enzymatische Amplifizierungsverfahren zum Einsatz. Hierbei handelt es sich u.a. um die Verfahren Polymerasekettenreaktion (PCR, US Patente 4.683.195, 4.683.202, EP 0 200 362, EP 0 201 184; Hoffmann-La Roche), Ligasekettenreaktion (LCR, Abbott Diagnostics, North Chicago, IL, USA), Strand Displacement Amplification (SDA, Walker et. al. [1993], PCR Methods Appl. 3: 1-6, Becton-Dickinson Research Center) und Transcription-Mediated Amplification (TMA, Gen-Probe Inc., San Diego, CA), mit deren Hilfe bei extrem hoher Sensitivität Analytnukleinsäure-Konzentrationen gemessen werden können. Voraussetzung für den quantitativen Einsatz aller aufgeführten Technologien ist die Verfügbarkeit geeigneter synthetischer oder nativer Nukleinsäure-Standards exakt definierter Konzentration, die entweder als externe, d.h. in parallelen Ansätzen amplifizierte, oder interne Standards (d.h. simultan im selben Ansatz amplifizierte sog. Kompetitoren) verwendet werden. Während die Herstellung geeigneter Standards dem Fachmann bekannt ist (Zimmermann und Mannhalter 1996, Biotechniques 21: 268-279, Köhler et al. 1995, Quantitation of mRNA by polymerase chain reaction - Nonradioactive PCR methods. Heidelberg, Springer-Verlag), bestehen bislang ungelöste verfahrenstechnische Probleme bei der Überführung dieser Standards in eine anwendungsbereite und stabile Form, welches eine Grundvoraussetzung für die reproduzierbare Messung unbekannter Nukleinsäurekonzentrationen ist. Insbesondere bestehen

Probleme bei der optimalen Lagerung hoch-verdünnter Nukleinsäuren. Diese beruhen im wesentlichen darauf, daß in der Praxis meist mit extrem niedrig konzentrierten Standard-Verdünnungsreihen gearbeitet wird (ca. 1 - 100000 Moleküle pro Reaktionsansatz), die trotz Lagerung bei Temperaturen zwischen -20°C und -80°C häufig instabil sind (Köhler et al. 1997, BioTechniques 23: 722-726). Diesem Problem wird u.a. so begegnet, daß niedrig-konzentrierte Nukleinsäure-Verdünnungen in der Form stabilisiert werden, daß der Verdünnung eine definierte Menge einer spezifischen Träger-Nukleinsäure zugesetzt wird, welche der zu detektierenden Nukleinsäuresequenz eine möglichst minimale Sequenzhomologie aufweist (De Kant et al. 1994, Biotechniques 17: 934-942, Köhler et al. 1997, BioTechniques 23: 722-726). Dies führt aber nicht immer zum Erfolg (siehe Fig.1), so daß allgemein empfohlen wird, alle erforderlichen Verdünnungsschritte ausgehend von einer Stammlösung definierter Konzentration tagtäglich neu durchzuführen. Dies wiederum ist aber mit dem Nachteil verbunden, daß die eingesetzten Standards arbeitsintensiv hergestellt werden müssen, variierender Pipettiergenauigkeit unterliegen und kostbare, verdünnte Chargen nur teilweise verbraucht werden können. Somit erhöhen sich zwangsläufig Kosten und Zeitaufwand bei gleichzeitig verringerter Reproduzierbarkeit und Zuverlässigkeit der Methodik. Anwendungstechnisch gesehen ist die geschilderte Verfahrensweise somit unökonomisch, mehreren Störgrößen unterworfen und demzufolge für diagnostische Routinelabors ungeeignet.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, Gefäße und Methoden zu entwickeln, mit denen die oben erwähnten Nachteile der Verfahren gemäß dem Stand der Technik vermieden werden können und die einfach in der Anwendung, über einen längeren Zeitraum bei gleichbleibender Qualität lagerbar und Bestandteile von Testkits sein können.

Die Aufgabe wurde durch die Beschichtung von Reaktionsräumen mit definierten Standard-Nukleinsäurekonzentrationen gelöst, welches folgende Teilschritte enthält:

- Herstellung und Reinigung geeigneter adsorbierbarer Nukleinsäure-Standards
- Bestimmung der exakten Konzentration des Produktes mittels High Performance Liquid Chromatography (HPLC), nachfolgend Kalibrierung genannt
- Herstellung einer Verdünnungsreihe aus dem kalibrierten Standard unter Zusatz definierter Mengen einer Träger-Nukleinsäure
- erfindungsgemäße Adsorption der Standard/Trägernukleinsäuregemische an für enzymatische Amplifizierungsreaktionen geeignete Reaktionsräume, so daß diese als Standards



einsetzbaren, definiert beschichteten Gefäße in eine über lange Zeiträume haltbar Form überführt werden, ohne daß es zu Beeinträchtigungen der Qualität kommt.

Ebenfalls Gegenstand der Erfindung sind ein Satz von mindestens zwei Oligonukleotiden, ein Testkit entsprechend Erfordernissen eines Routinelabors und mehrere Verwendungsmöglichkeiten des Verfahrens.

Die nachfolgend beschriebene Erfindung stellt ein molekularbiologisches Verfahren dar, das eine

Grundlage zur vorzugsweise automatisierten quantitativen Messung kleinster Mengen von Analytnukleinsäuren in diversen biologischen Materialien in Verbindung mit vorhergehender enzymatischer Amplifikation darstellt. Das erfindungsgemäße Verfahren besteht darin, Nukleinsäuren in eine zur Standardisierung quantitativer enzymatischer Amplifizierungsreaktionen geeignete Form zu überführen. Überraschenderweise hat sich herausgestellt, daß die erfindungsgemäße Methode die Herstellung von Nukleinsäurebeschichteten, sog. "ready-to-use" Standard-Reaktionsräumen erlaubt, die sich als einfach in der Anwendung erwiesen haben, die problemlos über einen langen Zeitraum bei gleichbleibender Qualität lagerbar und als Bestandteile von Testkits zu verwenden sind, somit den Bedürfnissen von Routinediagnostiklabors insbesondere in Hinblick automatisierter Analysen besser gerecht werden.

Nukleinsäuren im Sinne der Erfindung sind einzelsträngige oder doppelsträngige DNA, RNA, synthetische Analoga von DNA und RNA, sowie DNA, deren native Desoxy-Thymidin (dT)-Basen durch Desoxy-Uracil (dU) vollständig oder partiell ersetzt sind. Die Herstellung geeigneter Nukleinsäure-Standards erfolgt in einer dem Fachmann bekannten Form, vorzugsweise mit Hilfe der PCR, unter Nutzung spezifischer Primer-Oligonukleotide (Beispiel 1, Punkt 1A-B). Als Nukleinsäure-Standards werden native, auf enzymatischem Wege hergestellte Amplifizierungsprodukte oder synthetische Nukleinsäuren verwendet, deren Nukleotidsequenz einer zu bestimmenden Sequenz homolog ist, vorzugsweise identisch oder gekennzeichnet durch eine oder mehrere Punktmutationen, Deletionen oder Insertionen ist, die vorzugsweise außerhalb der Primer- und Sondenbindungsstellen liegen. DNA-Standards werden mittels enzymatischer Amplifikation von Target-Sequenzen, vorzugsweise mittels PCR, hergestellt, während RNA-Fragmente in bekannter Weise mittels *in vitro* RNA-Synthese unter Nutzung von RNA-Polymerasen gewonnen werden können. Die hergestellten Nukleinsäurefragmente werden anschließend einer Reinigungsprozedur unterzogen, wobei DNA vorzugsweise mittels Agarosegelelektrophorese und anschließender Extraktion der Standard-Nukleinsäure aus dem Trenngel gereinigt wird (Beispiel 1, Punkt 1B), während *in vitro* hergestellte RNA in einer dem

Fachmann bekannten Weise aus dem *in vitro* Synthese-Ansatz extrahiert wird. Die exakte Messung der Konzentration des gereinigten Nukleinsäure-Produktes erfolgt vorzugsweise mittels HPLC (Köhler et al. 1997, BioTechniques 23:722-726, Beispiel 1, Punkt 2). Anschließend wird von der kalibrierten Standard-Nukleinsäure eine Verdünnungsreihe hergestellt. Zur Verdünnung von DNA-Standards wird eine DNA-Lösung verwendet, die hergestellt wird, indem vorzugsweise DNA des Lambda-Phagen (z.B. Stamm: lambda cl 857 Sam 7, 48502 bp, Lambda-DNA) mittels 5 x 1-minütiger Ultraschall-Behandlung in Fragmente von ca. 1-2 Kilobasen (kb) überführt wird (Beispiel 1, Punkt 3; die durchschnittliche Fragmentlänge wurde mittels Agarosegelelektrophorese ermittelt). Dieser Schritt soll die verbesserte Adsorption während des Lyophilisationsprozesses bewirken und zu erhöhter Haltbarkeit der Standard-Nukleinsäure im Reaktionsraum beitragen. Zur Verdünnung von RNA-Standards wird vorzugsweise eine Transport-RNA (tRNA)-Lösung verwendet (Köhler et al. 1995, Quantitation of mRNA by  $\times$  D polymerase chain reaction - Nonradioactive PCR methods. Heidelberg, Springer-Verlag).

Zur Quantifizierung eines Meßparameters werden verschiedene Standardverdünnungen hergestellt (Beispiel 1, Punkt 3), die vorzugsweise die Messung des gesamten physiologischen oder technologischen Konzentrationsbereiches des zu messenden Analyten erlauben. Hiervon werden Aliquote zur Beschichtung derjenigen Reaktionsräume verwendet, in welchen die zur Erstellung beispielsweise einer Eichkurve erforderlichen enzymatischen Nukleinsäureamplifikationen ablaufen sollen. Vorzugsweise werden 8 separate Reaktionsräume mit 8 verschiedenen Standardverdünnungen (sog. 8-er Strip) beschichtet. Erfindungsgemäß erfolgt die Beschichtung so, daß Aliquote der jeweiligen Standard-Nukleinsäure-Verdünnung supplementiert mit der Träger-Nukleinsäure direkt in den verwendeten Reaktionsräumen schonend getrocknet werden (Beispiel 1, Punkt 4). In einer besonders bevorzugten Weise erfolgt diese Lyophilisation unter Nutzung einer Vakuum-Zentrifuge. In einer weiteren Form der Ausgestaltung erfolgt die Trocknung mittels eines gleichwertigen Trocknungsverfahrens, beispielsweise einem Verfahren zur überhitzungsfreien Produkttrocknung unter Einsatz von Mikrowellen (z.B. vertrieben über GWE mbH, Leuna). Die -wie beschrieben- hergestellten, beschichteten Reaktionsräume sind dadurch gekennzeichnet, daß die adsorbierten Nukleinsäure-Standards so fest an der Innenseite des zur Beschichtung verwendeten Reaktionsraumes haften, daß beispielsweise ein problemloser Versand auf dem Postweg gewährleistet werden kann.

In den Figuren 1-3 ist beispielhaft dargestellt, welche Qualitätsanforderungen die mit dem erfindungsgemäßen Verfahren hergestellten Nukleinsäure-Standards erfüllen. Zum praxis-relevanten Test der auf dem beschriebenen Verfahren basierenden Produkte ist das derzeit beste,

äußerst reproduzierbare Ergebnisse liefernde ABI PRISM™ 7700 Sequence Detection System (Fa. Perkin-Elmer) eingesetzt worden. Mit diesem Detektionsautomaten lassen sich unter Nutzung des erfindungsgemäßen Verfahrens prinzipiell hoch reproduzierbare Eichkurven mit Korrelationen  $>-0.99$  erstellen (Fig.1). Die Erfindungsgemäß beschichteten Reaktionsräume, z.B. die sog. "optical" PCR tubes, sind dem derzeitigen Stand der Technik überlegen, da diese im Vergleich zu herkömmlich eingesetzten PCR-Standards deutlich stabiler sind (Fig.2) und selbst

bei Raumtemperatur über mindestens 50 Tage ohne Qualitätsverlust lagerbar sind (Fig.3).

Die beschichteten Reaktionsgefäße werden aufrecht stehend in einer geeigneten, 96 Gefäße aufnehmenden Träger-Box erfindungsgemäß mit einer selbstaftenden Folie (z.B. Plastik- oder Aluminium-Folie, Parafilm) verschlossen, um eine Kontamination mit Fremd-Nukleinsäuren während Lagerung und Transport zu vermeiden. Je ein mit Folie verschlossenen 8-er Strip, somit verschiedenen Konzentrationen der zur Beschichtung eingesetzten Nukleinsäuren enthaltend, wird als "ZeptoStrip" bezeichnet.

In den Reaktionsräumen können neben den kalibrierten Nukleinsäuren mindestens zwei spezifische als Primer bzw. Sonden fungierende markierte oder unmarkierte Oligonukleotide sowie weitere für die enzymatische Amplifikation erforderliche Reaktionskomponenten in lyophilisierter Form enthalten sein. Alternativ können verwendete Reaktionsräume auch alleinig die als spezifische als Primer bzw. Sonden fungierenden Oligonukleotide, die Träger-Nukleinsäure sowie weitere für die enzymatische Amplifikation erforderliche Reaktionskomponenten in lyophilisierter Form enthalten. Die erfindungsgemäßen Testkits bestehen aus mindestens einem "ZeptoStrip", mindestens zwei Oligonukleotiden sowie einer Träger-Nukleinsäure.

Das Wesen der Erfindung liegt in einer Kombination bekannter Elemente und neuer Lösungswege, die sich gegenseitig beeinflussen und in ihrer neuen Gesamtwirkung einen Gebrauchsvorteil und den erstrebten Erfolg ergeben, der darin liegt, daß nunmehr ready-to-use Standard-Reaktionsräume für den quantitativen Nachweis ausgewählter Nukleinsäuren in biologischen Substanzen zur Verfügung stehen.

Neben dem Abstellen der oben genannten Nachteile des Standes der Technik weist das erfindungsgemäße Verfahren somit eine Reihe von Vorteilen auf:

1. Ein manueller oder automatisierter Transfer von verdünnten, zur Standardisierung eingesetzten Nukleinsäuren in die verwendeten Reaktionskompartimente entfällt, da diese bereits im Reaktionsgefäß in lyophilisierter Form vorliegen. Damit erhöht sich wesentlich die

Nutzerfreundlichkeit, da die sofort einsetzbaren Standard-Strips nur entnommen und in eine 96-well Trägerplatte eingesetzt werden müssen. Nach Zugabe der vorzugsweise vorgemischten Reagenzien für die nachfolgende Amplifizierungsreaktion sind keine weiteren Manipulationen mehr notwendig. Diese Vereinfachung erlaubt somit eine konsequente Automatisierung quantitativer enzymatischer Reaktionen.

2. Da nunmehr keine Pipettierung konzentrierter Standards mehr erfolgt, ist eine potentielle Kontaminationsquelle ausgeschaltet und somit die Gefahr falsch-positiver Ergebnisse deutlich verringert.
3. Durch Überführen der Standard-Nukleinsäuren in ein nicht-wässriges Milieu wird a) potentiell ein unerwünschter mikrobieller Abbau der als Standards verwendeten Nukleinsäuren eingeschränkt bzw. verhindert, und b) eine Lagerfähigkeit selbst extrem niedrig konzentrierter Nukleinsäuren über längere Zeiträume selbst bei Zimmertemperatur erreicht (Fig. 2 und 3). Diese Vorzüge vereinfachen ganz wesentlich sowohl Versand als auch Anwendung der auf diesem Verfahren beruhender Testkits.
4. Die verwendete Träger-Nukleinsäure verhindert eine unspezifische Standard-Adsorption an die zur Herstellung der Verdünnungsreihen eingesetzten Einweg-Materialien und ist - nachweisbar bei Zusatz zu einem PCR-Ansatz- gleichzeitig ein potenter "Enhancer" der enzymatischen Amplifikation.

Fig.1 zeigt eine typische Eichkurve, die mittels "real-time" PCR-Produktmessung am ABI PRISM™ 7700 Sequence Detection System (Fa. Perkin-Elmer) unter Nutzung mit dem erfindungsgemäßen Verfahren hergestellter mdm-2 (murine double minute-2) Nukleinsäurestandards (Verwendung eines Standard-Strips, d.h. 8 verschiedener, lyophilisierter mdm-2 Standard-Nukleinsäurekonzentrationen) erhalten wurde (Beispiel 1, Punkt 5). Die errechnete Korrelationskoeffizient beträgt in diesem Fall -0.996.

Fig.2 zeigt in graphischer Form den Vergleich des erfindungsgemäßen Beschichtungsverfahrens und Nutzung der "real-time" Detektion wie in Abb. 1 mit dem derzeitigen Stand der Technik. Herkömmliche, d.h. in wässrigem Milieu gelagerte und am Versuchstag aliquotierte mdm-2 Standard-DNA Fragmente verschiedener Konzentration (50, 250, 2500, 10000 und 50000 Moleküle pro PCR-Ansatz), supplementiert mit Träger-DNA, wurden mit lyophilisierten Standards gleicher Konzentration verglichen. Während konventionell gelagerte Standards insbesondere sehr niedriger Konzentration (50 bzw. 250 Moleküle pro Ansatz) bereits nach 14

Tagen Lagerung und 4-maligen Einfrier-/Auftau-Zyklen vollständig abgebaut sind (äußert sich in der Abbildung durch Erreichen des Threshold Cycles 40, welcher der Amplifizierbarkeit 0 entspricht), ist bei Verwendung lyophilisierter Standards (ZeptoStrip) selbst bei niedrigsten verwendeten Nukleinsäurekonzentrationen kein Verlust feststellbar.

Fig.3 zeigt PCR-Resultate, die mit ZeptoStrips erhalten wurden, welche alternativ entweder bei -20°C oder bei Zimmertemperatur gelagert wurden. Es ist zu erkennen, daß innerhalb der ersten 15 Tage Lagerung unabhängig von der Lagertemperatur identische PCR-Ergebnisse, d.h. weitgehend übereinstimmende  $C_T$ -Werte (d.h. parallele Kurven) erzielt wurden. Gleichzeitig ist sichtbar, daß darüberhinaus bei Zimmertemperatur mindestens eine Lagerfähigkeit von 50 Tagen ohne Verluste an adsorbierter Nukleinsäure möglich ist.

Die erfindungsgemäße Verwendung der mit Nukleinsäuren beschichtete Reaktionsgefäße liegt in Testkits zur Bestimmung ausgewählter Nukleinsäuren in biologischen Substanzen. Die Testkits bestehen aus mindestens einem mit Folie verschlossenen 8-er Strip, mindestens zwei Oligonukleotiden sowie einer Träger-Nukleinsäure.

Die folgenden Beispiele dienen der Verdeutlichung der Erfindung, ohne sie auf diese Beispiele zu beschränken.

### Ausführungsbeispiele

#### Beschichtung von Polypropylen-Reaktionsräumen mit definierten Konzentrationen von Doppelsträngiger mdm-2 Standard-DNA

##### 1. Herstellung eines mdm-2 spezifischen Standard-DNA Fragmentes mittels PCR

A. cDNA-Herstellung aus Gesamt-RNA, isoliert aus ADR5000 T-Lymphom-Zelllinie (resistenzselektiert mit 5 µg Adriamycin pro ml Kulturmedium)

- 1 µg mittels RNazol™ "B" (Tel-Test, Friendswood, TX, USA) gereinigte RNA in einem 20-µl Standard Reaktionsansatz, bestehend aus AMV Reverse Transcriptase Puffer (250 mmol/l Tris/HCl, pH 8.3; 250 mmol/l KCl, 50 mmol/l MgCl<sub>2</sub>, 50 mmol/l Dithiothreitol, 2.5 mmol/l Spermidin), 5 U AMV Reverse Transcriptase, 0.5 mmol/l eines jeden dNTPs (Promega,

Madison, WI, USA), 10 U rekombinanter RNase Inhibitor (AGS, Heidelberg, FRG), 200 ng Oligo (dT) (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden), 1 Std. bei 42 °C in cDNA transkribieren

## B. PCR-Amplifizierung und Reinigung des Produktes

### ➤ PCR

- Je 2 µl-Aliquote der hergestellten cDNA werden in 6 identischen 50-µl Standard PCR Ansätzen bestehend aus 100 ng jedes 3' bzw. 5' Primers, 5 µl 10x Taq Polymerase Puffer (100 mmol/l Tris/HCl, pH 8.3; 500 mmol/l KCl, 15 mmol/l MgCl<sub>2</sub>, 0.01% [wt/vol] Gelatine), 1.5 U AmpliTaq® Polymerase (Norwalk, CT, USA, Perkin-Elmer), und 8 µl dNTPs (0.2 mmol/l jedes Nukleotids unter Verwendung von dUTP anstatt dTTP) im GeneAmp®9600 Thermalcycler (Perkin-Elmer) amplifiziert.
- Programm: 94°C für 30 s, 55°C für 30 s, 72°C für 1 min  
35 Zyklen
- Sequenzen der verwendete Amplifizierungsprimer (GenBank Accession Code für mdm-2: I25341)  
MDM2PR1 (1245-1264) 5'-GCC.AAG.AAG.ATG.TGA.AAG.AG-3'  
MDM2PR2 (1439-1455) 5'-ACT.GGG.CAG.GGC.TTA.TT-3'
- Länge des amplifizierten DNA-Fragmentes: 211 bp

### ➤ Reinigung des 211 bp Fragmentes mittels Agarosegel-Elektrophorese

- 1.5 % Agarose-Gel (Easy-Cast™ Minigel, AGS, Heidelberg) herstellen, Gelslots mit 6-er Kamm, Kammer mit TAE-Puffer füllen (Submarine-Gel)
- die hergestellten PCR-Ansätze poolen und quantitativ aufragen
- Elektrophorese bei 100V, 45 min ausführen
- Ethidiumbromid-gefärbte Banden im UV-Licht sichtbar machen, möglichst genau und schnell mit Skalpell ausschneiden, in 1.5 ml-Eppendorfgefäße überführen
- DNA aus Gelblocks mittels QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden) laut Vorschrift reinigen (Elution mit H<sub>2</sub>O)

## 2. Kalibrierung der Standard-Stammlösung mittels HPLC

### ➤ HPLC-Equipment:

3-Line Degasser DG-980-50, PU-980 Intelligent HPLC Pump, Low Pressure Gradient Former, UV-975 UV/VIS Detector, AS-950 Intelligent Sampler, Column-Thermostat Jetstream 2 (Jasco Labor und Datentechnik GmbH, Gross-Umstadt, FRG).

➤ *Stationäre Phase:*

TSK DEAE-NPR Säule (4.6 mm ID, Länge: 35 mm) und DEAE-NPR Vorsäule (4.6 mm ID, Länge: 5 mm) (TosoHaas GmbH, Stuttgart, FRG)

➤ *Mobile Phase:*

Puffer A: 25 mmol/l Tris/HCl, 1 mol/l NaCl; pH 9.0

Puffer B: 25 mmol/l Tris/HCl; pH 9.0

➤ *HPLC-Laufbedingungen:*

- Druck: 80-120 bar (maximal 200 bar)
- Flußrate: 1 ml/min
- Temperatur: 20°C
- UV-Detektion bei 260 nm
- Analyt: ca. 10-200 ng gereinigtes PCR-Fragment, mit Puffer B auf 40 µl supplementieren, Injektion von 20 µl pro Lauf jeweils in Doppelbestimmung
- Standard (separater Lauf): 36 µl Puffer B plus 4 µl Low Mass DNA Ladder™ (Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA), bestehend aus 6 glatt-endigen DNA-Fragmenten im Bereich 100 bis 2000 bp (Endkonzentration: 5 bis 100 ng DNA pro Bande), Injektion von 20 µl pro Lauf (Doppelbestimmung)
- Diskontinuierliches Gradientenprogramm über 25 min wie folgt durchführen:
  1. Equilibrierung der Säule mit 25% Puffer A in Puffer B
  2. 25% A in B: Probenauftrag bis 0.5 min
  3. 25-43% A in B: Linearer Gradient von 0.5-4.5 min
  4. 43-60% A in B: Linearer Gradient von 4.5-20 min
  5. 60-100% A in B: Linearer Gradient von 20-22 min
  6. 100-25% A in B: Linearer Gradient von 22-24 min
  7. 25% A in B: Equilibrierung von 24-25 min

Die Datengewinnung erfolgt mittels Integration der Peaks durch Borwin™ Chromatography Software, Version 1.20 (IMBS Developpements, Frankreich). Zur exakten Messung der Konzentration des gereinigten DNA-Standards wird die Fläche unter den individuellen Peaks

ermittelt. Die unbekannte Konzentration der Standard-Nukleinsäure wird anhand der mittels Low Mass DNA Ladder™ erhaltenen Eichkurve berechnet.

### 3. Herstellung einer Standard-Verdünnungsreihe mit Träger-DNA

Träger-Nukleinsäure:

10 OD Lambda (dam+) DNA (aus Bakteriophage lambda cl857 Sam7, AGS GmbH, Heidelberg), gelöst in 0.5 ml 10 mM Tris/HCl, pH 8.0; 1 mM EDTA, wird in 5x 1 min-Intervallen und zwischenzeitlicher Kühlung auf Eis mittels Ultraschall-Bad (Transsonic T570, Ultrasonics) bei maximaler Leistung in ca. 1-2 kb-Fragmente überführt, davon wird eine 10 ng/ml-Verdünnung hergestellt (1:100), im weiteren als Lambda-DNA bezeichnet

Herstellung der Standard-Verdünnungsreihe für mdm-2 (20x conc.)

| Standard-No. | Verdünnung SL<br>(Herstellung)                 | Endkonzentration<br>[zmol/Ansatz] | Moleküle pro<br>Ansatz |
|--------------|--|-----------------------------------|------------------------|
| 1            | 1: 10 <sup>4</sup>                             | 419.75                            | 252.773                |
| 2            | 1: 10 <sup>4</sup> → 1:5 (20µl [No.1]+80µl λ)  | 83.95                             | 50.555                 |
| 3            | 1: 10 <sup>4</sup> → 1:10 (10µl [No.1]+90µl λ) | 41.986                            | 25.277                 |
| 4            | 1: 10 <sup>4</sup> → 1:25 (10µl [No.3]+90µl λ) | 16.794                            | 10.111                 |
| 5            | 1: 10 <sup>5</sup> → (20µl [No.3]+180µl λ)     | 4.199                             | 2.528                  |
| 6            | 1: 10 <sup>6</sup> → 1:4 (25µl [No.5]+75µl λ)  | 1.050                             | 632                    |
| 7            | 1: 10 <sup>6</sup> → 1:10 (10µl [No.5]+90µl λ) | 0.420                             | 253                    |
| 8            | 1: 10 <sup>6</sup> → 1:50 (2µl [No.5]+98µl λ)  | 0.084                             | 51                     |

λ = Lambda-DNA, 10 ng/µl

Zur Herstellung der Standard-Gebrauchslösungen werden je 5 µl der Standard-Verdünnungsreihe in separate 1.7 ml Multi Twist Top Vials (Sorenson Bio Science, Salt Lake City, UT, USA; Vertrieb: Carl Roth GmbH.; Kat.-Nr.: 8184.1) pipettiert. Zur Herstellung multifunktionaler Strips (d.h. Strips, die zur sequentiellen oder simultanen quantitativen Messung mehrerer verschiedener Nukleinsäure-Sequenzen geeignet sind) werden weitere 19 Standards (jeweils 5 µl pro Standard-Nukleinsäure) zugesetzt und -wenn erforderlich- bis zu einem Endvolumen von 100 µl mit Lambda-DNA ergänzt.



#### 4. Beschichtung der Reaktionsräume

- je 5 µl der unter Punkt 3 hergestellten Standard-Gebrauchslösungen in 8 verschiedene "optical tubes" (Fa. Perkin-Elmer, Kat.-Nr.: N8010935) pipettieren (von Position A1-A8 in abnehmender Konzentration), vorzugsweise diese Aliquotierung zur Verbesserung der Qualität mit einem Pipettier-Roboter (z.B. Biomek 2000, Fa. Beckman) ausführen
- Amplifikationsgefäße in schwarze Eppendorf Zentrifugen-Adapter (0.2 ml) einsetzen und Proben 30 min lang in Vakuumzentrifuge (z.B. Univapo 100 H mit Unijet Refrigerated Aspirator, Fa. UniEquip) bis zur völligen Trockene bei eingeschalteter Rotor-Gegenheizung lyophilisieren.

#### 5. Test der hergestellten Strips mittels ABI PRISM™ 7700 Sequence Detection System

optimierte mdm-2 TaqMan™-Methode:

**Programm:** 2-Step-PCR 95°C 10:00 min, anschließend  
 40 Zyklen 95°C 00:15 min  
 60°C 01:00 min

**Reaktionsbedingungen:** 6 mM MgCl<sub>2</sub>  
 10 pM Primer mdm2Pr11 und mdm2Pr21  
 2 pmol mdm2Probe  
 50 ng Lambda-DNA (5 µl)  
 2.5 U AmpliTaqGold™

dNTPs, Puffer aus TaqMan™ PCR Core Reagents Kit mit AmpliTaq™Gold

Ansatzvolumen: 50 µl

**verwendete Primer- und Sondensequenzen** (GenBank Accession Code mdm-2: I25341)

mdm2Pr11 (1295-1318) 5'-GAG.AGT.GTG.GAA.TCT.AGT.TTG.CCC-3'

mdm2Pr21 (1352-1373) 5'-TGC.AAC.CAT.TTT.TAG.GTC.GAC.C-3'

mdm2Probe (1320-1350) 5'-FAM-TTA.ATG.CCA.TTG.AAC.CTT.GTG. TGA.TTT.GTC.A-  
 XT-3'-TAMRA

## Patentansprüche

1. Mit nativen, synthetisch oder enzymatisch hergestellten Nukleinsäuren beschichtete Reaktionsräume, dadurch gekennzeichnet, daß die Beschichtung auf nicht-kovalentem Wege an chemisch oder biochemisch nicht-modifizierte Oberflächen der Innenwandung von Reaktionsräumen erfolgt.
2. Reaktionsräume nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß sie aus Glas- oder Plastik-Gefäßen oder aus Glaskapillaren bestehen, die mit nativen, synthetischen oder partiell-synthetischen Nukleinsäuren (DNA, RNA, synthetische Analoga von DNA und / oder RNA, dU-haltige DNA) beschichtet sind.
3. Verfahren zur Herstellung der Reaktionsräume nach den Ansprüchen 1 und 2 unter Verwendung von Standard-Nukleinsäuren, dadurch gekennzeichnet, daß definierte Mengen gelöster nativer, synthetischer oder partiell-synthetischer Nukleinsäuren (DNA, RNA, synthetische Analoga von DNA und / oder RNA, dU-haltige DNA) direkt in zur enzymatischen Amplifikation geeignete Reaktionsräume aliquotiert werden und die Nukleinsäure anschließend nicht-kovalent direkt an die Innenwandung des Reaktionsraumes durch schonende Lyophilisierung der Probe adsorbiert wird.
4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß Gefäße bzw. Glaskapillaren beschichtet werden.
5. Verfahren nach den Ansprüchen 3 und 4, dadurch gekennzeichnet, daß konzentrierte Stock-Lösungen der zu adsorbierenden Nukleinsäuren mittels eines geeigneten HPLC-Analyseverfahrens exakt kalibriert werden, bevor diese zur Herstellung der zur Beschichtung verwendeten Nukleinsäure-Verdünnungsstufen eingesetzt werden.
6. Verfahren nach den Ansprüchen 3 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß während des Lyophilisationsprozesses den zu adsorbierenden Standard-Nukleinsäuren eine definierte Menge einer spezifischen Träger-Nukleinsäure beigemischt wird, die zuvor mittels eines physikalischen Verfahrens (z.B. Ultraschallbehandlung) in Fragmente einer mittleren Länge von ca. 1-2 kb überführt wurde und welche der zu detektierenden Nukleinsäuresequenz eine möglichst minimale Sequenzhomologie aufweist.
7. Verfahren nach den Ansprüchen 3 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß die DNA des Lambda-Phagen eingesetzt wird.

8. Verfahren nach den Ansprüchen 3 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß entsprechende Reaktionsräume simultan mit einer Vielzahl (mindestens 2) diverser, Analytsequenzspezifischer kalibrierter Nukleinsäuren, ggf. unterschiedlichem zellulären oder organischen Ursprungs bzw. aus verschiedenen Spezies stammend, beschichtet werden.
9. Verfahren nach den Ansprüchen 3 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß die Beschichtung von 96, im Mikrotiterplatten-Format angeordneten Reaktionsräumen mit 12x 8 sequenzspezifischen Standard-Nukleinsäuren abnehmender, den gesamten physiologischen oder technologischen Konzentrationsbereich der zu messenden Analytnukleinsäure erfassenden Konzentrationen (höchste Konzentration: A1-12, niedrigste Konzentration: H1-12), erfolgt.
10. Verfahren nach den Ansprüchen 3 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß die beschichteten Reaktionsräume aufrecht stehend in einer geeigneten, 96 Gefäße aufnehmenden Träger-Box verschlossen werden.
11. Verfahren nach den Ansprüchen 3 bis 10, wobei in den Reaktionsräumen neben den kalibrierten Nukleinsäuren mindestens zwei spezifische als Primer bzw. Sonden fungierende markierte oder unmarkierte Oligonukleotide, die Träger-Nukleinsäure sowie weitere für die enzymatische Amplifikation erforderliche Reaktionskomponenten in lyophilisierter Form enthalten sind oder spezifische als Primer bzw. Sonden fungierende markierte oder unmarkierte Oligonukleotide, die Träger-Nukleinsäure sowie weitere für die enzymatische Amplifikation erforderliche Reaktionskomponenten in separaten Gefäßen ohne Nukleinsäure-Standard in lyophilisierter Form enthalten sind.
12. Verwendung der mit Nukleinsäuren beschichteten Reaktionsräume nach den Ansprüchen 1 bis 11 in Testkits zur Bestimmung ausgewählter Nukleinsäuren in biologischen Substanzen.
13. Verwendung nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß die Testkits aus mindestens einem mit Folie verschlossenen ZeptoStrip (8-er Strip aus verschlossenen, mit 8 verschiedenen Nukleinsäure-Konzentrationen beschichteten Reaktionsräumen), mindestens 2 Oligonukleotiden sowie einer Träger-Nukleinsäure bestehen.

Fig.1

Charakteristische Eichkurve, erstellt mittels PCR-Produkt Messung am ABI PRISM™ 7700 Sequence Detection System unter Verwendung eines "ZeptoStrips", welcher mit dem erfindungsgemäßen Verfahren mit mdm-2 DNA beschichtet wurde, sowie der zugehörigen Methode (siehe Ausführungsbeispiel 1, Punkt 5),  $r = -0.996$ .

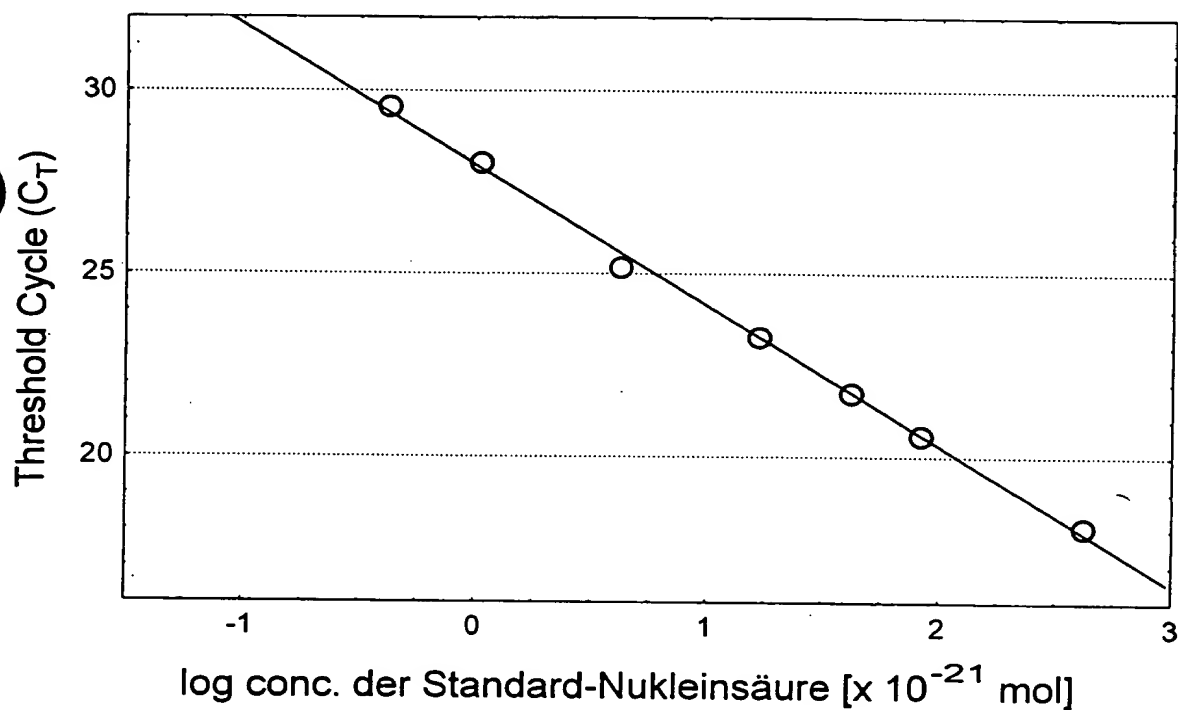


Fig.2

Vorteile von ZeptoStrips (ZS) im Vergleich zu Standard-Nukleinsäuren, die nach derzeitigem Stand der Technik konventionell im wässrigen Milieu gelagert wurden. Gestrichelte Linien: konventionelle Lagerung, durchgezogene Linien: ZeptoStrip. Legende: Initiale Zahl von Nukleinsäuremolekülen per PCR-Ansatz.

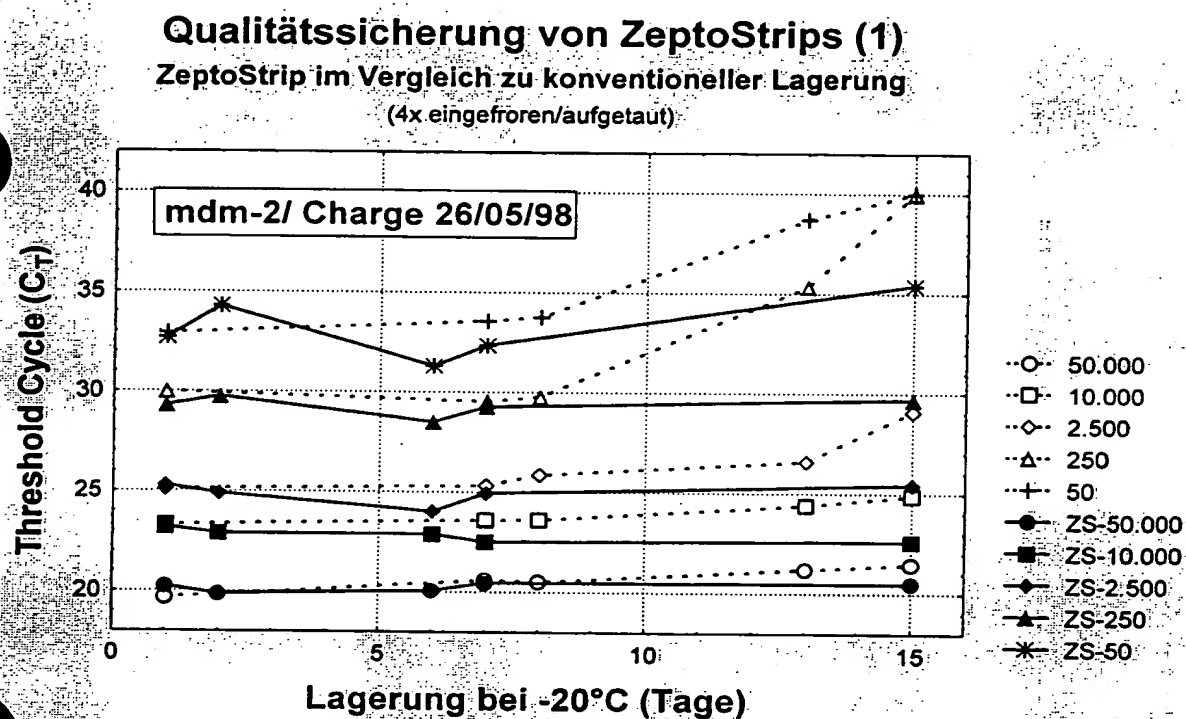
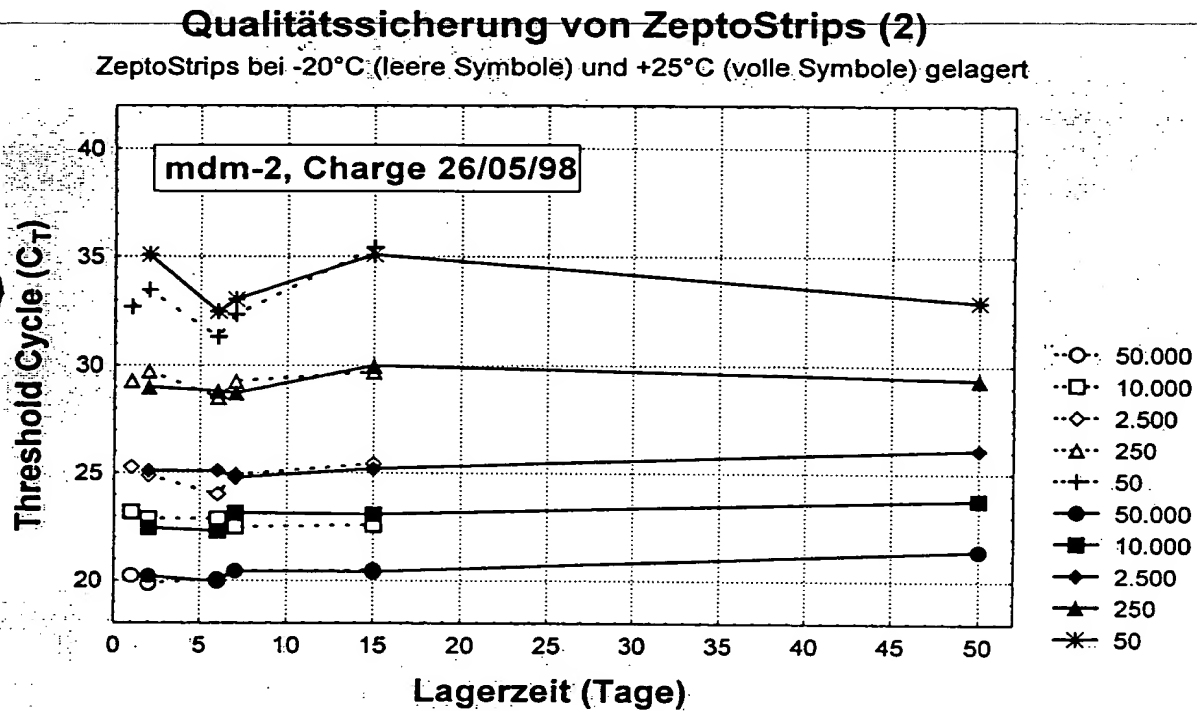


Fig.3

Lagerfähigkeit von "ZeptoStrips" über einen verfolgten Zeitraum von 50 Tagen ohne Qualitätsverlust. Legende: Initiale Zahl von Nukleinsäuremolekülen per PCR-Ansatz.



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER: \_\_\_\_\_**

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**

**This Page Blank (uspto)**